

(57) 要約

CHO細胞で生産された、配列表配列番号1のアミノ酸配列を有するHMWヒトMP52と命名されたタンパク質、HMWヒトMP52を生産する方法および有効成分としてHMWヒトMP52を含有する医薬組成物。

HMWヒトMP52は骨誘導促進作用を有するので、骨疾患などの治療または予防に使用され得る。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|-------------|----|-------------|----|------------|
| AL | アルバニア | DE | ドイツ | LI | リヒテンシュタイン | PL | ポーランド |
| AM | アルメニア | DK | デンマーク | LC | セントルシア | PT | ポルトガル |
| AT | オーストリア | EE | エストニア | LK | スリランカ | RO | ルーマニア |
| AU | オーストラリア | ES | スペイン | LR | リベリア | RU | ロシア連邦 |
| AZ | アゼルバイジャン | FI | フィンランド | LS | レソト | SD | スーダン |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | FR | フランス | LT | リトアニア | SE | スウェーデン |
| BB | バルバドス | GA | ガボン | LU | ルクセンブルグ | SG | シンガポール |
| BE | ベルギー | GB | イギリス | LV | ラトヴィア | SI | スロベニア |
| BF | ブルキナ・ファソ | GE | グルジア | MC | モナコ | SK | スロヴァキア |
| BG | ブルガリア | GN | ギニア | MD | モルドヴァ共和国 | SN | セネガル |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | MG | マダガスカル | SZ | スワジランド |
| BR | ブラジル | HU | ハンガリー | MK | マケドニア旧ユーゴスラ | TD | チャド |
| BY | ベラルーシ | IE | アイルランド | | ヴァチカン共和国 | TG | トーゴ |
| CA | カナダ | IL | イスラエル | ML | マリ | TJ | タジキスタン |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IS | アイスランド | MN | モンゴル | TM | トルクメニスタン |
| CG | コンゴ | IT | イタリア | MR | モリタニア | TR | トルコ |
| CH | スイス | JP | 日本 | MW | マラウイ | TT | トリニダード・トバゴ |
| CI | コート・ジボアール | KE | ケニア | MX | メキシコ | UA | ウクライナ |
| CN | 中国 | KG | キルギスタン | NE | ニジェール | UG | ウガンダ |
| CU | キューバ | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | NL | オランダ | US | アメリカ合衆国 |
| CZ | チェコ共和国 | KR | 大韓民国 | NO | ノルウェー | UZ | ウズベキスタン |
| | | KZ | カザフスタン | NZ | ニュージーランド | VN | ヴェトナム |

明 細 書

新規なタンパク質HMWヒトMP 5 2

技 術 分 野

5 本発明は新規なHMWヒトMP 5 2およびHMWヒトMP 5 2からなる特に軟骨および骨誘導促進のための医薬組成物に関する。特に、医薬組成物は、骨代謝異常による骨疾患例えば骨粗鬆症治療のため、骨折治療のため、また整形外科的再構築、骨移植、美容外科および歯科治療の目的のために有用である。更に、該組成物は軟骨疾患の治療に有用である。

10 背 景 技 術

ビタミンD₃、カルシトニン、エストロゲンおよびビスホスホネート誘導体を含む医薬組成物が実際に臨床で骨疾患の治療に使用されてきた。しかし、それらの治療結果は完全に満足すべきものではなく、より良い医薬組成物が非常に望まれている。

15 TGF- β ジーンスーパーファミリーに属する成長因子例えばBMP、TGFおよびインヒビン関連タンパク質が創傷治癒および組織修復に有用なことが報告されている。これらのタンパク質のうちいくつかは骨誘導活性を有することも知られている。PCT出願 WO 93/16099 および WO 95/04819 には、ヒトTGF- β 様タンパク質をコードしているDNA配列および好適なタンパク質としてヒトMP 5 2が開示されて

20 いる。

E. E. Storm等は、Nature, 1994年, 368巻, 639~642頁に、3種のマウス成長/分化因子、すなわち、GDF 5、GDF 6およびGDF 7がTGF- β ジーンスーパーファミリーの新規なメンバーとして同定され、

25 またGDF 5遺伝子での突然変異によりマウスで短肢症を惹起することを報告している。マウスGDF 5は、1個のアミノ酸を除いて、ヒトMP 5 2と同一の予想成熟型のアミノ酸配列を有している。しかしこの報

告には、骨疾患の治療にこれらのタンパク質を使用することについては示唆されていない。

発明の開示

本発明の目的は、骨または軟骨誘導促進剤として有用であるさらに進んだ成長因子を提供することである。

成熟MP 5 2は120個のアミノ酸を有するタンパク質とみなされている。そのアミノ酸配列は、配列表配列番号1 (W0 95/04819) の355番目から474番目までである。驚くべきことに、適当なDNA配列を発現させると、種々のアミノ酸配列の長さを有するタンパク質、すなわち成熟MP 5 2およびHMW(高分子量)ヒトMP 5 2を製造することを本発明者等は見出した。本発明は、骨誘導作用を有し、骨疾患の予防および(または)治療に有用であるHMWヒトMP 5 2を確認するのに初めて成功したものである。

本発明は次の定義のいずれかに入るHMWヒトMP 5 2に関する：

(1) 配列表配列番号1の1番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質。

(2) 配列表配列番号1の121番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質。

(3) 配列表配列番号1の122番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質。

(4) 配列表配列番号1の121番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドおよび配列番号1の122番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質。

(5) 配列表配列番号1の1番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドおよび配列番号1の121番目および(または)122番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質。

(6) 配列表配列番号1の1番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドおよび配列番号1の355番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質。

5 (7) 配列表配列番号1の121番目および(または)122番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドおよび配列番号1の355番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質。

タンパク質は通常システインで形成される-S-S-結合を介して二量体として存在する。本明細書でのペプチドは単量体を意味する。

10 HMWヒトMP52は未分化間葉細胞からの軟骨の形成を誘起し、骨芽細胞の分化、成熟を促進する。従って、HMWヒトMP52は骨代謝異常に因る骨疾患例えば骨粗鬆症の予防および(または)治療に有効である。これらのものはまた骨折の治癒過程を促進する。更に、これらのものは整形外科的再構築、骨移植および歯科治療においてその骨誘導活性により有用である。更にまた、HMWヒトMP52は軟骨代謝異常に
15 因る軟骨障害の予防および(または)治療に有効である。

本発明のその他の目的は、HMWヒトMP52の生産方法を提供するものであり、本発明方法では、配列番号1に示すHMWヒトMP52をコードしているDNA配列を適当な宿主細胞に導入し、DNA発現およびタンパク質形成に好ましい条件下で培養し、次いで該宿主細胞から採
20 集された他のタンパク質から該タンパク質を単離する。

本発明の構成のうちで、配列番号1に説明したDNA配列は、HMWヒトMP52、またそのより短い部分の生産に使用し得る。但し、それらがHMWヒトMP52をなおコードしていて、かつ適当なベクター/宿主細胞系でのDNA配列の発現が可能であることを条件とする。
25 適当な発現系は当業者に知られていて、配列番号1のDNA配列の長さに対する最小要件が何であるかを通常の実験により定めることができ

る。

タンパク質形成に続いて、タンパク質をそれ自体既知の方法により宿主細胞から採取し、最後にHMWヒトMP 5 2を単離する。特に、HMWヒトMP 5 2の単離は、当業者に知られている極めて正確に分化する単離方法を用いて実施することができる。例えば、逆相HPLCがこの目的に適合するものと考えられる。

本発明のその他の目的は、HMWヒトMP 5 2を含む医薬組成物を提供することにある。場合により、本組成物は通常の担体物質、添加物質、希釈剤および（または）賦形剤を含有していてもよい。本発明の医薬組成物は、骨誘導活性を有するため、骨、軟骨、結合組織、皮膚、粘膜、上皮または歯の損傷の治療または予防、人工歯根への適用、および創傷治癒および組織再生プロセスへの適用に有用である。

HMWヒトMP 5 2の1種を個別にあるいは、HMWヒトMP 5 2の混合物の形態で投与することが可能である。

骨代謝異常に因る骨疾患の治療のためには、HMWヒトMP 5 2を注射例えば静脈注射、筋肉内注射および腹腔内注射、経口投与、非経口投与例えば座剤、または他の任意の常法により全身投与することができる。

骨折の治療のためには、これらのものは注射、経口および非経口投与により全身または局所投与することができる。また、HMWヒトMP 5 2を含むマトリックスを骨折した骨に近い領域に移植するのが好ましい。適当なマトリックスは、天然重合体例えばコラーゲンおよびフィブリン接着剤（fibrin glue）および生体内で分解可能な人工重合体例えばポリ乳酸グリコール酸共重合体である。

整形外科的再構築、美容外科、骨移植および人工歯根の場合、HMWヒトMP 5 2を例えば移植すべき骨および歯の表面にコラーゲン・ペースト、フィブリン接着剤およびその他の接着性物質によって被覆するこ

とができる。このものは骨および歯がそのまわりに移植される組織、骨または歯槽骨にも適用できる。骨移植の場合、このものは天然および人工骨双方に使用することができる。人工骨および歯の材料としては、通常
5 5 材料例えば金属、セラミック、ガラスおよびその他の天然または人工無機物質が使用される。ハイドロキシアパタイトが好適な人工物質である。人工骨は、内部の濃密な物質およびその他の部分の多孔性の材料により構成することができる。例えば人工骨の内部材料に密度の高い金属、そしてその外側の材料に多孔性の金属を使用する。人工骨の材料の
10 1つに多孔性ハイドロキシアパタイトがあげられる。このような多孔性材料を用いると、HMWヒトMP 5 2はその中に浸透することができる。人工骨の表面をざらざらにして、そこにHMWヒトMP 5 2を保持することができる。

骨再構築を促進するために、ガン性骨組織を除去した部分にHMWヒトMP 5 2を投与できる。

15 HMWヒトMP 5 2の投与量は、目的および適用方法に基づいて定められる。一般に、全身投与のときは、投与量は $1\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}/\text{kg}$ である。人工歯根に使用するとき、好適な投与量は $30\mu\text{g}\sim 30\text{mg}/\text{部位}$ である。

これらの精製HMWヒトMP 5 2は任意の通常の形態例えば注射液、
20 丸剤、カプセル剤および座剤に処方することができる。局所投与のためには、HMWヒトMP 5 2をマトリックス例えばコラーゲン、フィブリン接着剤およびポリ乳酸グリコール酸共重合体に包含させる。人工歯根および骨移植のためには、このものを骨および歯の表面または多孔性部分に投与する。

25 図面の簡単な説明

図1はHMWヒトMP 5 2発現ベクターpMSS 9 9(5.0 kb)のプラスミドマップである。pMSS 9 9でのHMWヒトMP 5 2 DNA

塩基配列は、配列表の配列番号1に示す576番目から2279番目のヌクレオチドである。

発明を実施するための最良の形態

実施例を示して本発明を具体的に説明する。

5 実施例1

HMWヒトMP52の製造

(1) HMWヒトMP52の発現ベクターの構築

Biopharm GmbHのDr. Hoettenから提供されたヒトMP52遺伝子を含むpSK52sベクターをHind IIIで消化後、ヒトMP52遺伝子を含むDNAフラグメントを0.8%低融点アガロースゲルからの抽出により単離し、Behringwerke AGのDr. Gerd Zettlmeisslから提供されたpABstopベクターのHind III部位に結合させた。図1に示すHMWヒトMP52発現ベクターのpMSS99 (5.0kb)の構造をDNA塩基配列決定および制限酵素消化により確認した。pMSS99のHMWヒトMP52 DNA塩基配列は、配列表の配列番号1に示した576番目から2279番目までのヌクレオチドであった。

(2) HMWヒトMP52を生産するCHOクロンの確立

Behringwerke AGのDr. Zettlmeisslから提供されたCHO-DUKX-B11細胞、すなわちCHO細胞の突然変異株に、pMSS99およびDr. Zettlmeisslから提供されたpSVOAdhfrをりん酸カルシウムDNA共沈法によって導入した。次に、HMWヒトMP52の高産生細胞株をメトトレキセート(MTX)を用いる遺伝子増幅法により確立した。

pMSS99の10 μ gおよびpSVOAdhfrの2 μ gを25mM HEPES-140mM NaCl-0.75mM Na₂HPO₄ (pH 7.05) 1mlに溶解し、次に2.5M CaCl₂ 50 μ lと混合した。得られた沈殿を10cmディッシュ中のCHO-DUKX-B11細胞に重層し、

- 室温で30分間放置した。次に、10%ウシ胎児血清(FBS)を含む
リボーおよびデオキシリボヌクレオチド含有MEM ALPHA培地
(MEM α^+) 8mlを細胞層に加え、CO₂インキュベーター中4~6
時間培養した。細胞を10%グリセロールで室温3分間処理した後、
5 10%FBSを含むMEM α^+ 培地で2日間培養した。次に10%透
析FBSを含むリボーおよびデオキシリボヌクレオチド不含MEM
ALPHA培地(MEM α^-)中に細胞を撒き直して形質転換株を選択
した。形質転換クローンを単離し、次に記述するウェスタンブロッ
ティング分析によりHMWヒトMP52の発現を検定した。
- 10 HMWヒトMP52産生クローンを更にメトトレキセート(MTX)の
濃度を上げることにより段階的に選択して、pSVOAdhfr遺伝子
に従ってMP52遺伝子を増幅させた。400nM MTXで1~3 μ g
のHMWヒトMP52/10⁶細胞/24時間産生する数個のクローン
が得られた。
- 15 (3) 培養上清液中のHMWヒトMP52の検出
- 次のとおりのウェスタンブロッティング分析により、HMWヒトM
P52の発現についてクローンを検定した：培養上清液(1~15 μ l)
を還元条件下にSDS-PAGE(15~25%ポリアクリルアミド勾
配ゲル、第一化学)により分離し、次にタンパク質をPVDF膜(Clear
20 Blot Membrane-P, ATTO)に転写した。膜をBlock Ace(大日本製薬)
で1時間ブロックし、Tris緩衝食塩水(TBS)ですすぎ、次に10
倍希釈されたBlock Ace中のHMWヒトMP52に対するニワトリ
抗体10 μ g/mlで一晩処理した。膜を0.1% Tween 20を含む
TBS(TTBS)で洗った後、膜を10倍希釈Block Ace中のウ
25 サギ抗ニワトリIgG-ALP複合体(Sigma A9171)で処理した。膜を
TTBSで洗い、アルカリ性ホスファターゼ複合体基質キット(BIO
-RAD)と反応させてMP52に相当するバンドを可視化した。

(4) HMWヒトMP52生産CHOセル・ラインの細胞培養

HMWヒトMP52の最高生産性を有するCHOセル・ラインのMC-2〔このMC-2は、1995年6月21日に、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所〔日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）〕に受託番号FERM BP-5142として国際寄託された〕を10%FBS、400nM MTX、100U/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシンを加えたMEM α を入れたローラーボトルで増殖させた。MC-2細胞がコンフルエンスに達した後、細胞を血清を含まないMEM α で洗い、次に10mM HEPES (pH 7.3)、10KIU Aprotinin、1mM 酪酸ナトリウム、6μg/mlセレン酸ナトリウム、5μg/mlトランスフェリン、18μg/mlエタノールアミン、9μg/mlインシュリン、100U/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシンを添加した血清を含まないDME/F12中で培養した。馴化培地を1週間毎日採集した。

(5) HMWヒトMP52の精製

CHO培養上清液および0.1容量0.2Mりん酸ナトリウム緩衝剤、pH6.0を混合し、50mM NaCl、20mMりん酸ナトリウム緩衝剤、pH6.0で予め平衡化しておいたPOROS HSカラム（10ml、PerSeptive Biosystems）にかけた。タンパク質を0.05~2M直線勾配NaClで溶出し、10mlフラクション20本に採集した。溶離されたMP52は3つのタイプの単量体として認められ、それらの見掛け分子量は、還元条件下でのSDS-PAGE分析により約52、40および14kDであると測定された。これらの単量体は、3つのタイプのホモ二量体（104kD、80kDおよび28kD）および3つのタイプのヘテロ二量体（92kD：40kD~52kD、66kD：14kD~52kD、および54kD：14kD~40kD）を形成し、これらの二量体すべてをHMW (high molecular weight: 高分子量) ヒトMP52と命名した。但し、28

kDホモ二量体はヒトMP 52の成熟ホモ二量体として知られている (W0 95/04819) と思われるので除外する。従って、104 kDホモ二量体および80 kDホモ二量体を上記のフラクションから単離してN末端アミノ酸配列および生物活性を検定した。

- 5 5番目から9番目までのフラクションをプールし、約10倍に濃縮した。濃縮物を、1 M NaClを含む20 mMりん酸ナトリウム緩衝剤、pH 7.1で予め平衡化した Superdex 200pg (1.6 cm I.D. × 60 cm、Pharmacia) に充填した。流速0.5 ml/分で溶離を行った。104 kDホモ二量体を含むフラクションと80 kDホモ二量体を含むフラクションとを別個にプールした。各フラクションを逆相HPLCカラム (RESOURCE RPC、3 ml、Pharmacia) につけ、これらのタンパク質を35~40% アセトニトリルで溶出した。単離したHMWヒトMP 52の濃度を、SDS-PAGEゲルでのタンパク質のバンドのデンストメトリーにより測定した。
- 10
- 15 N末端アミノ酸配列分析は、パルス液ガス相シーケンサー (Applied Biosystems モデル476) を用いて、80 kDホモ二量体および104 kDホモ二量体について、それぞれ行った。結果を表1に示す。

表 1

| HMW MP52 | N-末端アミノ酸 |
|----------|--|
| 80kD | Lys Ala Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Ala Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys |
| 104kD | Ala Pro Asp Leu Gly Gln Arg Pro Gln Gly Thr |

- アミノ酸配列80 kDは配列表配列番号1の Lys 121または
25 Ala 122からArg 474に由来し、またアミノ酸配列104 kDはAla 1からArg 474に由来した。CHO細胞は3つのタイプのホモ二量体、104 kD、80 kDおよび28 kD、および3つのタイプの

ヘテロ二量体、すなわち 92 kD、66 kD および 54 kD の二量体を生産することが新たにわかった。

実施例 2

生物学的活性

- 5 新生児ラット頭蓋冠細胞からクローニングされた骨原性細胞様 ROB-C26 細胞 (Calcif. Tissue Int., 49 巻, 221~225 頁, 1991 年) を 1.5×10^4 細胞/ウェルの密度で 48-ウェル・マルチ・ウェルプレート (Coaster) にのせ、10% FBS 含有 MEM α 中で 3 日間前培養した。培地を除去した後、10% FBS を含有する新たな MEM α 10 および 10 mM HCl 中連続希釈した 80 kD または 104 kD HMW ヒト MP52 を培養物に加え、培地および添加物を 3 日目に交換しながら 6 日間培養した。細胞層をりん酸緩衝食塩水で洗い、1 mM $MgCl_2$ を含む 0.2% Nonidet で抽出した。アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性を Takuwa 等の方法 (Am. J. Physiol., 257 巻, E797~E803 頁, 1989 15 年) に従って測定した。表 2 に示すように、80 kD または 104 kD の HMW ヒト MP52 での ROB-C26 細胞の処理により、ウェル当りの ALP 総活性が濃度依存的に増大した。

20

25

表 2

ROB-C26セル・ラインのALP活性に対する
80kDおよび104kD HMWヒトMP52の影響

| | 化合物 | 濃度(ng/ml) | ALP活性 (nmol/分/ウエル) |
|----|---------------------------|-----------|-----------------------|
| 5 | ビークル(10mM HCl) ー処理比較対照 | — | 5.47±0.81 |
| | 80kD HMW ヒトMP52 | 8.6 | 5.42±1.09 |
| | | 29 | 7.00±0.89 |
| | | 86 | 14.30±0.24* |
| 10 | | 290 | 16.28±0.19* |
| | | 860 | 18.41±1.95* |
| | 104kD HMW ヒトMP52 | 11 | 6.51±0.90 |
| | | 38 | 7.54±0.29 |
| | | 110 | 8.32±0.12* |
| 15 | | 380 | 12.07±0.53* |
| | | 1100 | 16.98±0.47* |

数値は、3または4培養物の平均±標準偏差を表わす。

* p<0.01、ビークル処理した比較対照との比較(Dunnett
テスト)。

配 列 表

配列番号 : 1

配列の型 : 対応するタンパク質のヌクレオチド

配列の長さ : 2 7 0 3

5 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直線状

分子の型 : cDNA - mRNA

起源

生物名 : ヒト (homo sapiens)

10 640~720 bp シグナルペプチド

1783~2142 bp 成熟ペプチド

組織の種類 : ヒト胎児

配列記載 : 配列番号 1 :

CCATGGCCTC GAAAGGGCAG CGGTGATTTT TTTCACATAA ATATATCGCA CTAAATGAG 60
 15 TTTAGACAGC ATGACATCAG AGAGTAATTA AATTGGTTTG GGTGGAATT CCGTTTCCAA 120
 TTCCTGAGTT CAGGTTTGTA AAAGATTTTT CTGAGCACCT GCAGGCCTGT GAGTGTGTGT 180
 GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGA AGTATTTTCA CTGGAAGGA TTCAAACTA 240
 GGGGGAAAAA AAAACTGGAG CACACAGGCA GCATTACGCC ATTCTTCCTT CTGGA AAAA 300
 TCCCTCAGCC TTATACAAGC CTCCTTCAAG CCCTCAGTCA GTTGTGCAGG AGAAAGGGGG 360
 20 CGGTGGCTT TCTCCTTTCA AGAACGAGTT ATTTTCAGCT GCTGACTGGA GACGGTGCAC 420
 GTCTGGATAC GAGAGCATTT CCACTATGGG ACTGGATACA AACACACACC CGGCAGACTT 480
 CAAGAGTCTC AGACTGAGGA GAAAGCCTTT CCTTCTGCTG CTA CTGCTGC TGCCGCTGCT 540
 TTGAAAGTC CACTCCTTTC ATGGTTTTTC CTGCCAAACC AGAGGCACCT TTGCTGCTGC 600
 CGCTGTCTC TTTGGTGTC TTCAGCGGCT GGCCAGAGG ATG AGA CTC CCC AAA 654

25

Met Arg Leu Pro Lys

-25

CTC CTC ACT TTC TTG CTT TGG TAC CTG GCT TGG CTG GAC CTG GAA TTC 702

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | Leu | Leu | Thr | Phe | Leu | Leu | Trp | Tyr | Leu | Ala | Trp | Leu | Asp | Leu | Glu | Phe | |
| | | | -20 | | | | | -15 | | | | | | | | -10 | |
| | ATC | TGC | ACT | GTG | TTG | GGT | GCC | CCT | GAC | TTG | GGC | CAG | AGA | CCC | CAG | GGG | 750 |
| | Ile | Cys | Thr | Val | Leu | Gly | Ala | Pro | Asp | Leu | Gly | Gln | Arg | Pro | Gln | Gly | |
| 5 | | -5 | | | | | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | |
| | ACC | AGG | CCA | GGA | TTG | GCC | AAA | GCA | GAG | GCC | AAG | GAG | AGG | CCC | CCC | CTG | 798 |
| | Thr | Arg | Pro | Gly | Leu | Ala | Lys | Ala | Glu | Ala | Lys | Glu | Arg | Pro | Pro | Leu | |
| | | | | | | 15 | | | | 20 | | | | | | 25 | |
| | GCC | CGG | AAC | GTC | TTC | AGG | CCA | GGG | GGT | CAC | AGC | TAT | GGT | GGG | GGG | GCC | 846 |
| 10 | Ala | Arg | Asn | Val | Phe | Arg | Pro | Gly | Gly | His | Ser | Tyr | Gly | Gly | Gly | Ala | |
| | | | | | | 30 | | | | 35 | | | | | | 40 | |
| | ACC | AAT | GCC | AAT | GCC | AGG | GCA | AAG | GGA | GGC | ACC | GGG | CAG | ACA | GGA | GGC | 894 |
| | Thr | Asn | Ala | Asn | Ala | Arg | Ala | Lys | Gly | Gly | Thr | Gly | Gln | Thr | Gly | Gly | |
| | | | | | | 45 | | | | 50 | | | | | | 55 | |
| 15 | CTG | ACA | CAG | CCC | AAG | AAG | GAT | GAA | CCC | AAA | AAG | CTG | CCC | CCC | AGA | CCG | 942 |
| | Leu | Thr | Gln | Pro | Lys | Lys | Asp | Glu | Pro | Lys | Lys | Leu | Pro | Pro | Arg | Pro | |
| | | | | | | 60 | | | | 65 | | | | | | 70 | |
| | GGC | GGC | CCT | GAA | CCC | AAG | CCA | GGA | CAC | CCT | CCC | CAA | ACA | AGG | CAG | GCT | 990 |
| | Gly | Gly | Pro | Glu | Pro | Lys | Pro | Gly | His | Pro | Pro | Gln | Thr | Arg | Gln | Ala | |
| 20 | 75 | | | | | 80 | | | | 85 | | | | | | 90 | |
| | ACA | GCC | CGG | ACT | GTG | ACC | CCA | AAA | GGA | CAG | CTT | CCC | GGA | GGC | AAG | GCA | 1038 |
| | Thr | Ala | Arg | Thr | Val | Thr | Pro | Lys | Gly | Gln | Leu | Pro | Gly | Gly | Lys | Ala | |
| | | | | | | 95 | | | | 100 | | | | | | 105 | |
| | CCC | CCA | AAA | GCA | GGA | TCT | GTC | CCC | AGC | TCC | TTC | CTG | CTG | AAG | AAG | GCC | 1086 |
| 25 | Pro | Pro | Lys | Ala | Gly | Ser | Val | Pro | Ser | Ser | Phe | Leu | Leu | Lys | Lys | Ala | |
| | | | | | | 110 | | | | 115 | | | | | | 120 | |
| | AGG | GAG | CCC | GGG | CCC | CCA | CGA | GAG | CCC | AAG | GAG | CCG | TTT | CGC | CCA | CCC | 1134 |

| | | |
|----|--|------|
| | Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu Pro Phe Arg Pro Pro | |
| | 125 130 135 | |
| | CCC ATC ACA CCC CAC GAG TAC ATG CTC TCG CTG TAC AGG ACG CTG TCC | 1182 |
| | Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ser | |
| 5 | 140 145 150 | |
| | GAT GCT GAC AGA AAG GGA GGC AAC AGC AGC GTG AAG TTG GAG GCT GGC | 1230 |
| | Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val Lys Leu Glu Ala Gly | |
| | 155 160 165 170 | |
| | CTG GCC AAC ACC ATC ACC AGC TTT ATT GAC AAA GGG CAA GAT GAC CGA | 1278 |
| 10 | Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys Gly Gln Asp Asp Arg | |
| | 175 180 185 | |
| | GGT CCC GTG GTC AGG AAG CAG AGG TAC GTG TTT GAC ATT AGT GCC CTG | 1326 |
| | Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe Asp Ile Ser Ala Leu | |
| | 190 195 200 | |
| 15 | GAG AAG GAT GGG CTG CTG GGG GCC GAG CTG CGG ATC TTG CGG AAG AAG | 1374 |
| | Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg Ile Leu Arg Lys Lys | |
| | 205 210 215 | |
| | CCC TCG GAC ACG GCC AAG CCA GCG GCC CCC GGA GGC GGG CGG GCT GCC | 1422 |
| | Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly Gly Gly Arg Ala Ala | |
| 20 | 220 225 230 | |
| | CAG CTG AAG CTG TCC AGC TGC CCC AGC GGC CGG CAG CCG GCC TCC TTG | 1470 |
| | Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg Gln Pro Ala Ser Leu | |
| | 235 240 245 250 | |
| | CTG GAT GTG CGC TCC GTG CCA GGC CTG GAC GGA TCT GGC TGG GAG GTG | 1518 |
| 25 | Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Gly Trp Glu Val | |
| | 255 260 265 | |
| | TTC GAC ATC TGG AAG CTC TTC CGA AAC TTT AAG AAC TCG GCC CAG CTG | 1566 |

| | | |
|----|---|------|
| | Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys Asn Ser Ala Gln Leu | |
| | 270 275 280 | |
| | TGC CTG GAG CTG GAG GCC TGG GAA CGG GGC AGG GCC GTG GAC CTC CGT | 1614 |
| | Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg Ala Val Asp Leu Arg | |
| 5 | 285 290 295 | |
| | GGC CTG GGC TTC GAC CGC GCC GCC CGG CAG GTC CAC GAG AAG GCC CTG | 1662 |
| | Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val His Glu Lys Ala Leu | |
| | 300 305 310 | |
| | TTC CTG GTG TTT GGC CGC ACC AAG AAA CGG GAC CTG TTC TTT AAT GAG | 1710 |
| 10 | Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp Leu Phe Phe Asn Glu | |
| | 315 320 325 330 | |
| | ATT AAG GCC CGC TCT GGC CAG GAC GAT AAG ACC GTG TAT GAG TAC CTG | 1758 |
| | Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr Val Tyr Glu Tyr Leu | |
| | 335 340 345 | |
| 15 | TTC AGC CAG CGG CGA AAA CGG CGG GCC CCA CTG GCC ACT CGC CAG GGC | 1806 |
| | Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly | |
| | 350 355 360 | |
| | AAG CGA CCC AGC AAG AAC CTT AAG GCT CGC TGC AGT CGG AAG GCA CTG | 1854 |
| | Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu | |
| 20 | 365 370 375 | |
| | CAT GTC AAC TTC AAG GAC ATG GGC TGG GAC GAC TGG ATC ATC GCA CCC | 1902 |
| | His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro | |
| | 380 385 390 | |
| | CTT GAG TAC GAG GCT TTC CAC TGC GAG GGG CTG TGC GAG TTC CCA TTG | 1950 |
| 25 | Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu | |
| | 395 400 405 410 | |
| | CGC TCC CAC CTG GAG CCC ACG AAT CAT GCA GTC ATC CAG ACC CTG ATG | 1998 |

Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met
 415 420 425
 AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA CCA CCC ACC TGC TGT GTG CCC ACG 2046
 Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr
 5 430 435 440
 CGG CTG AGT CCC ATC AGC ATC CTC TTC ATT GAC TCT GCC AAC AAC GTG 2094
 Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val
 445 450 455
 GTG TAT AAG CAG TAT GAG GAC ATG GTC GTG GAG TCG TGT GGC TGC AGG 2142
 10 Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
 460 465 470
 TAG CAGCACTGGC CCTCTGTCTT CCTGGGTGGC ACATCCCAAG AGCCCCCTTCC 2195

 475
 15 TGCACTCCTG GAATCACAGA GGGGTCAGGA AGCTGTGGCA GGAGCATCTA CACAGCTTGG 2255
 GTGAAAGGGG ATTCCAATAA GCTTGCTCGC TCTCTGAGTG TGA CT TGGGC TAAAGGCCCC 2315
 CTTTATCCA CAAGTTCCCC TGGCTGAGGA TTGCTGCCCG TCTGCTGATG TGACCAGTGG 2375
 CAGGCACAGG TCCAGGGAGA CAGACTCTGA ATGGGACTGA GTCCCAGGAA ACAGTGCTTT 2435
 CCGATGAGAC TCAGCCCACC ATTTCTCCTC ACCTGGGCCT TCTCAGCCTC TGGACTCTCC 2495
 20 TAAGCACCTC TCAGGAGAGC CACAGGTGCC ACTGCCTCCT CAAATCACAT TTGTGCCTGG 2555
 TGA CT TCCCTGGGAC AGTTGAGAAG CTGACTGGGC AAGAGTGGGA GAGAAGAGGA 2615
 GAGGGCTTGG ATAGAGTTGA GGAGTGTGAG GCTGT TAGAC TGTTAGATTT AAATGTATAT 2675
 TGATGAGATA AAAAGCAAAA CTGTGCCT 2703

25

請 求 の 範 囲

1. (1) 配列表配列番号1の1番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質、
- (2) 配列表配列番号1の121番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質、
- (3) 配列表配列番号1の122番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質、
- (4) 配列表配列番号1の121番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドおよび配列番号1の122番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質、
- (5) 配列表配列番号1の1番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドおよび配列番号1の121番目および（または）122番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質、
- (6) 配列表配列番号1の1番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドおよび配列番号1の355番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質、
- (7) 配列表配列番号1の121番目および（または）122番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドおよび配列番号1の355番目から474番目までのアミノ酸配列を有するペプチドからなる二量体タンパク質、および
- それらの混合物
- からなる群から選択されるHMWヒトMP52と命名されたタンパク質。
2. 配列表配列番号1に示す少なくとも721番目から2145番目までのDNA配列を含有するDNAを適当な宿主細胞に導入し、そして該DNA配列の発現およびタンパク質形成を可能とする条件下で宿

主細胞を培養することからなる請求項 1 記載の HMW ヒト MP 5 2 の生産方法。

3. 請求項 1 記載の HMW ヒト MP 5 2 の少なくとも 1 種を活性成分として含有する医薬組成物。

5 4. 整形外科的再構築、骨移植、美容外科または人工歯根に使用するための請求項 3 記載の医薬組成物。

5. 骨形成、骨、軟骨、結合組織、皮膚、粘膜、上皮または歯の損傷の治療または予防を促進するため、人工歯根での適用のため、および創傷治癒および組織再生過程での適用のための請求項 3 記載の医薬組成物の使用。
10

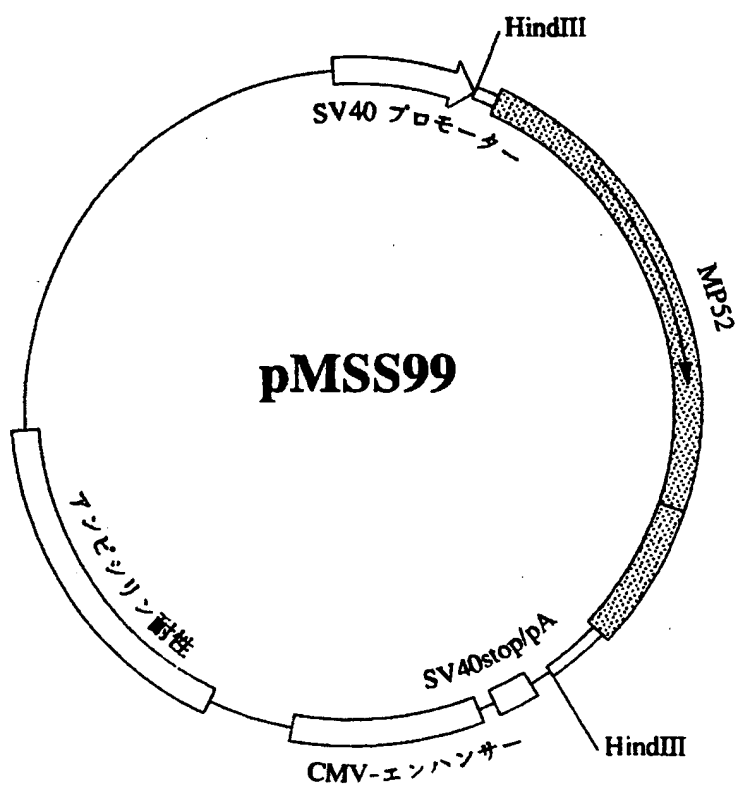
6. 骨粗鬆症または骨折の治療のための請求項 3 記載の医薬組成物の使用。

15

20

25

第 1 図



BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C07K14/51, C12P21/02, C12N5/10, A61K38/17 //
(C12P21/02, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C07K14/51, C12P21/02, C12N5/10, A61K38/17

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X/Y | Biochem. Biophys. Res. Commun., 204(2), Gertrud Hotten et al., (1994), p. 646-652, particularly p. 646, p. 650 | 1, 2/1-4 |
| Y | WO, 95/04819, A1 (Biopharm. Gesellschaft zur Biotechnologischen en Twicklung von Pharmakambh), February 16, 1995 (16. 02. 95) & DE, 4420157, A1 & AU, 9474986, A & ZA, 9405992, A & EP, 713529, A1 & CZ, 9600357, A3 | 1 - 4 |
| P,A | WO, 96/14335, A1 (The Government of the United States of America), May 17, 1996 (17. 05. 96) & AU, 9511202, A | 1 - 4 |
| A | WO, 94/15949, A1 (Johns Hopkins University School of Medicine), July 21, 1994 (21. 07. 94) & EP, 690871, A1 | 1 - 4 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

October 18, 1996 (18. 10. 96)

Date of mailing of the international search report

October 29, 1996 (29. 10. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02065

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 5, 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 5 and 6 are considered to be methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods, and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/51, C12P21/02, C12N5/10,
A61K38/17 // (C12P21/02, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/51, C12P21/02, C12N5/10,
A61K38/17

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI、WPI/L
BIOSIS PREVIEWS
CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X/Y | Biochem. Biophys. Res. Commun., 204(2), Gertrud Hotten et al., (1994), p. 646-652 特に p. 646, p. 650 | 1, 2/1-4 |
| Y | WO, 95/04819, A1 (BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON PHARMAKAMBI) 16.2月.1995(16.02.95) & DE, 4420157, A1 & AU, 9474986, A & ZA, 9405992, A & EP, 713529 , A1 & CZ, 9600357, A3 | 1-4 |
| P, A | WO, 96/14335, A1 (THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA) 17.5月.1996(17.05.96) & AU, 9511202, A | 1-4 |
| A | WO, 94/15949, A1 (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) 21.7月.1994(21.07.94) & EP, 690871, A1 | 1-4 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.10.96

国際調査報告の発送日

29.10.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

印

4 B 9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 5、6 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 5、6 は、人又は動物の身体の手術又は治療による処置方法および診断方法であると考えられ、
PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを
要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしてい
ない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に
従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求
の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追
加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納
付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載
されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。